

Initiation au laboratoire de microbiologie

Dr. LOUNAS A.

Laboratoire?

Définition :

Local aménagé pour effectuer des recherches scientifiques, des analyses biologiques.

Classification des laboratoires :

Groupes de risque	Spécification
Groupe de risque 1 (*risque faible ou nul pour les individus ou la collectivité*)	Micro-organismes **non pathogènes.**
Groupe de risque 2 (*risque modéré pour les individus, faible pour la collectivité*)	Germe **pathogène** capable de provoquer une **maladie humaine ou animale** mais qui ne présente vraisemblablement pas un sérieux danger pour le personnel de laboratoire, la collectivité, le bétail ou l'environnement. Une exposition en laboratoire est susceptible d'entraîner une infection grave, mais qui peut être traitée ou prévenue efficacement; par ailleurs le risque de propagation de l'infection est limité.
Groupe de risque 3 (*risque important pour les individus, faible pour la collectivité*)	Germe **pathogène** qui cause habituellement une **grave maladie** humaine ou animale, mais qui ne se transmet généralement pas d'un individu à l'autre. Il existe un traitement et des mesures préventives efficaces.
Groupe de risque 4 (*risque important pour les individus comme pour la collectivité*)	Germe **pathogène** qui cause habituellement **une grave maladie** humaine ou animale et **peut se transmettre** facilement d'un individu à l'autre, soit directement, soit indirectement. Il n'existe généralement ni traitement, ni mesures préventives efficaces.

Tableau 1. Classification des micro-organismes infectieux par groupe de risque

Classification des laboratoires :

Groupe de risque	*Niveau de sécurité*	*Type de laboratoire*	*Pratiques de laboratoire*	*Appareillage de sécurité*
1	*De base-niveau de sécurité biologique 1*	*Enseignement de base*	*BTM*	*Aucun ; palliasse sans protection*
2	*De base-niveau de sécurité biologique 2*	*Services de santé primaire ; laboratoires d'analyse ou de recherche*	*BTM et vêtements protecteurs ; logo de risque biologique*	*palliasse sans protection et BTM contre le risque d'aérosols*
3	*Confinement-niveau de sécurité biologique 3*	*Diagnostic spécialisé ; recherche*	*Comme niveau 2, + vêtements spéciaux, accès réglementé et flux d'air dirigé.*	*ESB ou autres moyens de confinement primaire pour l'ensemble des activités.*
4	*Confinement haute sécurité- niveau de sécurité biologique 4*	*Manipulation des germes pathogènes dangereux*	*Comme niveau , plus sas à air à l'entrée, douche à la sortie, et élimination spécifique des déchets.*	*ESB Class III, autoclave à deux portes.*

Tableau 2. ***Rapport entre groupe de risque et niveau de sécurité biologique***

Consignes de sécurité

❖Le port de la blouse est obligatoire

❖Se laver les mains avant et après manipulations

❖Délimiter le plan de travail, autour du bec bunsen.

❖Décontaminer le matériel septique à la fin des manipulations.

❖Décontaminer le plan de travail à la fin des manipulations.

❖Milieux de culture :

- Identifiés sur le fond
- Déposés à l'endroit dans l'étuve
- Transportés dans des portoirs (bouillon) ……

❖Ne jamais approcher de substances inflammables près de la flamme…

PRESENTATION DU LABORATOIRE

- **Gros Equipements** : Etuve, poupinel, autoclave, hotte, microscope, réfrigérateur...

- **Petit Matériel :**

* **Matériel volumétrique et de manipulation des liquides :** fioles jaugée, éprouvette, pipette, micropipette, burette, poire en caoutchouc.

*** Matériel de filtration et de séparation :** entonnoir, papier filtre quantitatif et qualitatif, papier Joseph.

*** Instruments** : support trépied, pince, anse de platine (anse d'inoculation), boite à coloration, boite de stockage de lame et lamelle, portoirs, balance.

Autoclave






COMINOX


6 8 2005

[redacted]

Poupinel



Poupinel



Etuve (incubateur)



Etuve (incubateur)



Hotte



Hotte





Microscope optique (M.O)



Microscope électronique à balayage



Microscope électronique à transmission



STERILISATION ET DESINFECTION

❑ TERMINOLOGIE :

➢ **Désinfection :** Opération permettant de tuer ou d'inactiver momentanément les bactéries ou les virus. La désinfection est valable seulement au moment où elle est pratiquée. Elle ne reste active que dans un laps de temps relativement court.

➢ **Stérilisation** : Processus par lequel on tue ou élimine les micro-organismes et les spores de toute nature aboutissant à un état d'asepsie.

➢ **Décontamination** : Tout processus destiné à éliminer ou tuer des micro-organismes. Ce terme désigne également l'élimination ou la neutralisation de produits chimiques ou radioactifs dangereux.

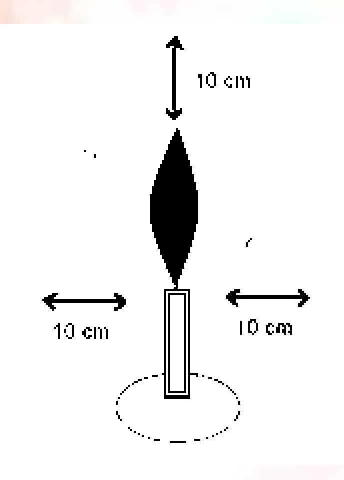
STERILISATION

Différentes techniques existent :

- • Stérilisation par chaleur sèche
- • Stérilisation par chaleur humide
- • Stérilisation par les gaz
- • Stérilisation par filtration
- • Stérilisation par radiations

STERILISATION PAR CHALEUR SÉCHE

Flambage :



- Fils de platine
- Pipettes Pasteur …..

STERILISATION PAR CHALEUR SÉCHE

Four Pasteur (poupinel) :180°C pd 90 min

Températures :

- 210° pendant 20 min.
- 180° ‘’ 90 min.
- 160° ‘’ 2 h
- 140° ‘’ 3 H

STERILISATION PAR CHALEUR SÉCHE

Four Pasteur (poupinel) :
son utilisation est :
Possible sur :

❖matériel métallique (instruments de dissection) pouvant tolérer de très hautes températures.
❖filtres, mortiers, …
❖verrerie sauf verreries de précision qui peuvent subir des déformations entraînées par la dilatation.

Inutilisable sur :

❖caoutchouc
❖matières plastiques
❖milieux de culture et tous les liquides

STERILISATION PAR CHALEUR HUMIDE

Autoclave (Autoclavage) : Tue les cellules végétatives et les endospores.

La durée de son utilisation est variable en fonction :

- ❖Du milieu
- ❖De la température utilisée
- ❖Du volume des récipients

Exemples :

- ❖Milieux de culture : 120° C pendant 20 min.
- ❖Textiles 135° C ‘’ 10 min.
- ❖Instruments 135° C ‘’ 10 min.

Température et pression sont interdépendantes :

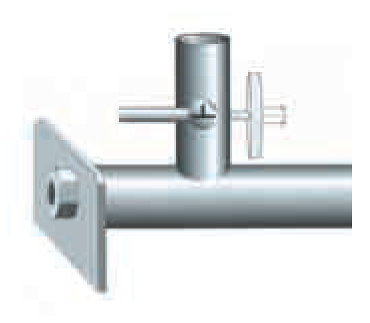
- ❖100° C → 1,006 bar
- ❖120° C → 2 bars
- ❖143° C → 4 bars

STERILISATION PAR FILTRATION









STERILISATION PAR FILTRATION

Diamètre du filtre de 0,2 µm = micro-organismes trop gros et sont donc retenus par le filtre.

Intéressante lors d'utilisation de solutions thermolabiles :

- acides aminés
- Vitamines
- hormones de croissance
- acides nucléiques
- une bonne partie des antibiotiques.

STERILISATION PAR RADIATION

Rayons UV : utilisés au lab

- décontamination de l’air
- décontamination des paillasses
- Décontamination des hottes….

Rayons X, σ :

- Stérilisation industrielle des boites de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

STERILISATION PAR LES GAZ (Agents chimiques)

Exp :
Formol (Formaldéhyde).
Oxyde d'éthylène (stérilisation industrielle)

Utilisation :

- stérilisation des salles de travail
- destruction des germes portés par des instruments souillés.
- stérilisation des lames et la verrerie qui ne passe pas en autoclave.



DESINFECTION

Différentes techniques existent :

Moyens physiques :

- Chaleur : Tyndallisation, Pasteurisation
- radiation.

Moyens chimiques :

- Antiseptiques
- Désinfectants.

DESINFECTION

Pasteurisation :

❖Traitement à chaud de liquides
❖Tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries
❖Les températures se situent entre 63 à 85°C selon la nature du produit.

On distingue :

❖Pasteurisation basse : 63° C pendant 30 min
❖Pasteurisation haute : 72° C pendant 20 sec
❖Flache pasteurisation (UHT) ou upérisation : 135-150 °C pendant 2-3 sec (procédé de stérilisation).

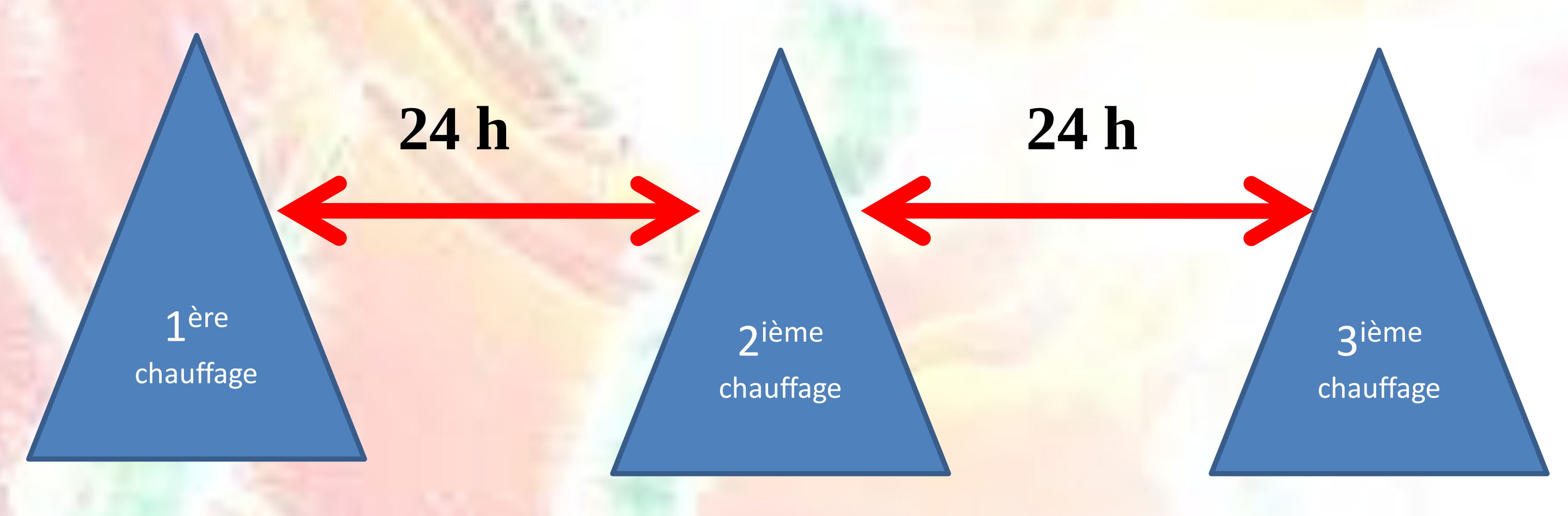
N.B : ces valeurs sont relatives à la pasteurisation du lait.

DESINFECTION

Tyndallisation :

Permet d'éliminer du milieu les formes de résistance des bactéries que sont les spores.

Utilisée notamment pour la conservation de la viande.



T° : 60-70°c
Durée : 30 à 60 min

T° : 60-70°c
Durée : 30 à 60 min

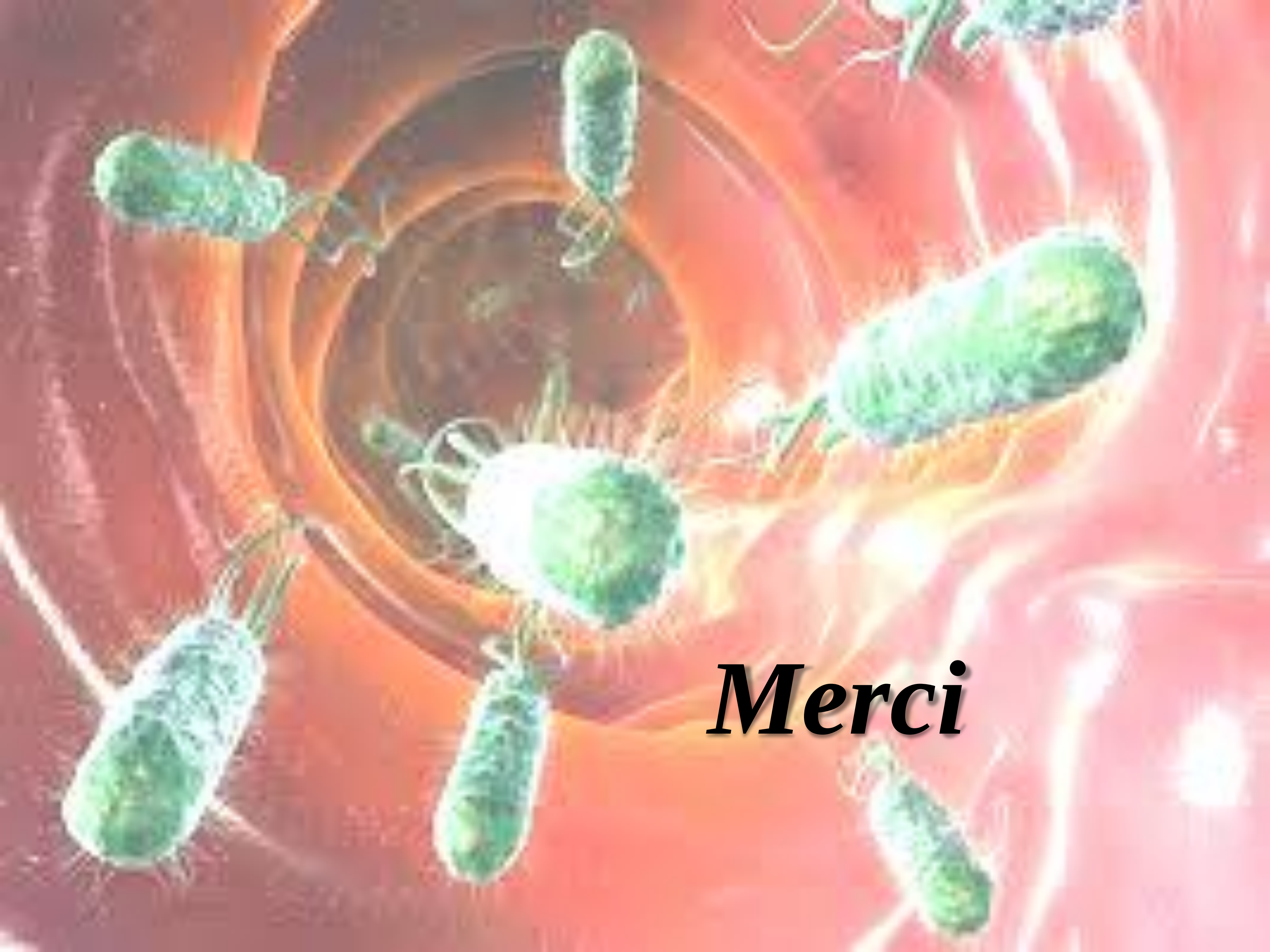
T° : 60-70°c
Durée : 30 à 60 min

DESINFECTION

Agents chimiques :

❖**Antiseptiques :** utilisés sur les tissus vivants.
Exp : alcool à 70°, Eosine, iode, eau oxygénée.

❖**Désinfectants :** utilisés sur la substance inerte.
Exp : eau de Javel, crésol, ammonium quaternaire…


Merci